

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of International Application No. PCT/JP00/02080 is a true and complete translation of the above-identified International Application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Dated this 26th day of September, 2001

Full name of the translator: Hisako KUMAZAWA

Signature of the translator:

Hisako Kumazawa

Post Office Address: c/o YUASA AND HARA, Section 206,
New Ohtemachi Bldg., 2-1,
Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo, JAPAN

13T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YCT-486	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02080	International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date (day/month/year) 01 April 1999 (01.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, 38/17, 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)		
Applicant JAPAN TOBACCO INC.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 20 September 2000 (20.09.00)	Date of completion of this report 17 January 2001 (17.01.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 22-23, 26-27

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 26-27 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matters of claims 26 and 27 relate to a method for treatment of the human body by therapy or diagnosis.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ the claims, or said claims Nos. 22-23 are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 26-27.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02080

V. Reasoned statement under Article 33(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	20-21,25,28	YES
	Claims	1-19,24	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-21,24-25,28	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21,24-25,28	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: EP, 892050, A2 (SmithKline Beecham Corp.), 20 January, 1999 (20.01.99)

Document 2: Yoshisuke Nishi et al., Proceedings of Biotechnology Symposium (1998), Vol.16, pages 161-166

Document 3: Yoshisuke Nishi et al., Proceedings of Biotechnology Symposium (1997), Vol.15, pages 159-164

Claims 1-19 and 24 do not appear to be novel or to involve an inventive step in view of document 1 cited in the ISR. Document 1 describes a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 4 of the present application, a gene encoding the said protein, an antibody to the protein, a recombination vector containing the above-stated gene, and a plasma converter containing the said recombination vector; and the said protein is a protein having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence No. 2 of the present application by deletion, substitution, addition or insertion of one or several amino acids, and has at least 50% or more homology with the amino acid sequence represented by SEQ ID No. 2 of the present application.

Claims 1-21, 24, 25 and 28 do not appear to involve an inventive step in view of documents 2 and 3 cited in the ISR. Document 2 describes an antibody having G-CSF inductive activity and a method of producing the antibody, and document 3 describes an antibody having G-CSF inductive activity and an about 45kDa antigen recognized by the said antibody. Therefore, a person skilled in the art could have easily conceived of using the antibody as a probe and of cloning a DNA encoding the antibody recognized by the above antibody by screening the cDNA library originated from macrophage cells.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02080

VI. Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
JP,11-106400,A [P,X]	20 April 1999 (20.04.1999)	30 September 1997 (30.09.1997)	

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02080

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 22 and 23 are not sufficiently supported by the specification.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 03 November 2000 (03.11.00)	Applicant's or agent's file reference YCT-486
International application No. PCT/JP00/02080	Priority date (day/month/year) 01 April 1999 (01.04.99)
International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	
Applicant SHA, Shiken et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
20 September 2000 (20.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Maria Kirchner Telephone No.: (41-22) 338.83.38
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

PCT REQUEST

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	31.3.00
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 08.03.2000)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japanese Patent Office (RO/JP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	YCT-486
I	Title of invention	NOVEL PROTEINS, GENE ENCODING THE SAME AND METHOD OF UTILIZATION THEREOF
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	JAPAN TOBACCO INC.
II-5	Address:	2-1, Toranomom 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422 Japan
II-6	State of nationality	JP
II-7	State of residence	JP
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	SHA, Shiken
III-1-5	Address:	c/o Affiliated Business Division Aobadai, Japan Tobacco Inc. 6-2, Umegaoka, Aoba-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 227-8512 Japan
III-1-6	State of nationality	CN
III-1-7	State of residence	JP

PCT REQUEST

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	AOKI, Yoshiko
III-2-5	Address:	c/o Affiliated Business Division Aobadai, Japan Tobacco Inc. 6-2, Umegaoka, Aoba-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 227-8512 Japan
III-2-6	State of nationality	JP
III-2-7	State of residence	JP
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	NISHI, Yoshisuke
III-3-5	Address:	c/o Affiliated Business Division Aobadai, Japan Tobacco Inc. 6-2, Umegaoka, Aoba-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 227-8512 Japan
III-3-6	State of nationality	JP
III-3-7	State of residence	JP
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio
IV-1-2	Address:	YUASA AND HARA Section 206, New Ohtemachi Bldg, 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan
IV-1-3	Telephone No.	03-3270-6641
IV-1-4	Facsimile No.	03-3246-0233
IV-1-5	e-mail	yulawpat@yuasa-hara.co.jp
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KURITA, Tadahiko; KOBAYASHI, Yasushi; MURAKAMI, Kiyoshi

PCT REQUEST

V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<p>AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ TZ UG ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT</p> <p>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT</p> <p>EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT</p> <p>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT</p>
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<p>AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW</p>
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	01 April 1999 (01.04.1999)
VI-1-2	Number	95092/1999
VI-1-3	Country	JP
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1
VII-1	International Searching Authority Chosen	Japanese Patent Office (JPO) (ISA/JP)

PCT REQUEST

Ch ck list		number of sheets	electronic file(s) attached
VIII	Request	6	-
VIII-1	Description (excluding sequence listing part)	37	-
VIII-2	Claims	7	-
VIII-3	Abstract	1	-
VIII-4	Drawings	0	-
VIII-5	Sequence listing part of description	7	-
VIII-6	TOTAL	58	
Accompanying items		paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-15	Nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form		-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
VIII-19	Language of filing of the international application	Japanese	
IX-1	Signature of applicant or agent		
IX-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio (seal)	
IX-2	Signature of applicant or agent		
IX-2-1	Name (LAST, First)	IMAI, Shosuke (seal)	
IX-3	Signature of applicant or agent		
IX-3-1	Name (LAST, First)	MASUI, Chuji (seal)	
IX-4	Signature of applicant or agent		
IX-4-1	Name (LAST, First)	KURITA, Tadahiko (seal)	
IX-5	Signature of applicant or agent		
IX-5-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi (seal)	
IX-6	Signature of applicant or agent		
IX-6-1	Name (LAST, First)	MURAKAMI, Kiyoshi (seal)	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	

PCT REQUEST

M

10-5	Internati nal Searching Auth rity	ISA/JP
10-6	Transmittal f s arch copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	----------------------------------------------------------------	--

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 05 FEB 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-486	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02080	国際出願日 (日.月.年) 31.03.00	優先日 (日.月.年) 01.04.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)		
出願人 (氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - I ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - II ☐ 優先権
 - III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - IV ☐ 発明の単一性の欠如
 - V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - VI ☒ ある種の引用文献
 - VII ☐ 国際出願の不備
 - VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 20.09.00	国際予備審査報告を作成した日 17.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二	4B 9281
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- ☐ 国際出願全体
- ☒ 請求の範囲 22-23、26-27

☒ この国際出願又は請求の範囲 26-27 は、国際予備審査をすることを要しない
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 26-27 は、人の身体の治療方法又は診断方法に関するものである。

- ☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- ☒ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 22-23 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 26-27 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

- ☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。
- ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	20-21、25、28	有
	請求の範囲	1-19、24	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-21、24-25、28	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-21、24-25、28	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

- 文献1: EP, 892050, A2(SMITHKLINE BEECHAM CORP.)20.1月.1999(20.01.99)
文献2: 西 義介 他、バイオテクノロジーシンポジウム予稿集(1998)Vol.16th,
p.161-166
文献3: 西 義介 他、バイオテクノロジーシンポジウム予稿集(1997)Vol.15th,
p.159-164

請求の範囲1-19及び24は、国際調査で引用された文献1により新規性及び進歩性を有しない。文献1には、本願の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、該タンパク質に対する抗体、前記遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体が記載されており、また、該タンパク質は、本願の配列番号2において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質であり、本願の配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有するタンパク質である。

請求の範囲1-21、24-25及び28は、国際調査で引用された文献2及び文献3により進歩性を有しない。文献2には、G-CSF誘導活性を有する抗体及びその製造方法が記載されており、文献3には、G-CSF誘導活性を有する抗体及び該抗体が認識する約45kDaの抗原が記載されているから、該抗体をプローブとして使用し、マクロファージ細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、前記抗体が認識する抗原をコードするDNAをクローニングすることは、当業者が容易になし得ることである。

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
JP, 11-106400, A 「P, X」	20. 04. 99	30. 09. 97	

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	----------------------------------------

VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 22-23 は、明細書によって十分に裏付けられていない。

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-486	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/02080	国際出願日 (日.月.年) 31.03.00	優先日 (日.月.年) 01.04.99	
出願人(氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 26-27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 26-27 は、人の身体の治療方法又は診断方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTファイル(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 892050, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 20. 1月. 1999 (20. 01. 99) & JP, 11-032783, A & CA, 2229464, A	1-19, 24
X	西 義介 他「高機能抗体の効率的選択プロセスの開発」 バイオテクノロジーシンポジウム予稿集(1998) Vol. 16th, p. 161-166	1-25, 28
X	西 義介 他「高機能抗体の効率的選択プロセスの開発」 バイオテクノロジーシンポジウム予稿集(1997) Vol. 15th, p. 159-164	1-25, 28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 05. 00

国際調査報告の発送日

30.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B

9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 11-106400, A(日本たばこ産業株式会社)20. 4月. 1999(20. 04. 99) (ファミリーなし)	1-25, 28
A	AOKI, Y. et al. "Stimulation of G-CSF gene expression in the macrophage cell line by contact with extracellular matrix proteins and a pre-B leukaemia cell line", Cytokine(1998)Vol. 10, No. 8, p. 596-602	1-25, 28



(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, 38/17, 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)	A1	(11) 国際公開番号 WO00/60075 (43) 国際公開日 2000年10月12日(12.10.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02080 (22) 国際出願日 2000年3月31日(31.03.00) (30) 優先権データ 特願平11/95092 1999年4月1日(01.04.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)(JP/JP) 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 謝 志堅(SHA, Shiken)(CN/JP) 青木良子(AOKI, Yoshiko)(JP/JP) 西 義介(NISHI, Yoshisuke)(JP/JP) 〒227-8512 神奈川県横浜市青葉区梅が丘6-2 日本たばこ産業株式会社 関連事業室青葉台内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: NOVEL PROTEINS, GENE ENCODING THE SAME AND METHOD OF UTILIZATION THEREOF (54) 発明の名称 新規タンパク質、それをコードする遺伝子、及びそれらの利用法 (57) Abstract A gene encoding an antigen recognized by G-CSF inductive antibody. Namely, a gene encoding: (a) a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 in Sequence Listing; (b) a protein having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 by deletion, substitution, addition or insertion of one or several amino acids and being capable of binding to an antibody having a granulocyte colony-stimulating factor inductive activity or a fragment thereof; or (c) a protein having an amino acid sequence with a homology of 50 % or more with the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and being capable of binding to an antibody having a granulocyte colony-stimulating factor inductive activity or a fragment thereof.		

本発明は、G-CSF誘導抗体の認識する抗原をコードする遺伝子として、

(a) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号2において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；または

(c) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質：をコードする遺伝子を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BH	バーレーン	GM	ガンビア	MD	ミルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

新規タンパク質、それをコードする遺伝子、及びそれらの利用法

5 技術分野

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体と反応性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子、およびそれらの利用法に関する。

背景技術

- 10 顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF) は、分子量は約18000から22000で、ヒトの場合174個（まれに178個）、マウスで178個のアミノ酸で構成されている。血液成分の白血球の一種である好中球の分化増殖を誘導する糖タンパクである。

- G-CSFは、成熟好中球の生存の延長や機能の亢進作用を有するが、エリスロポエチンによる赤芽球、インターロイキン3による芽球コロニーの形成も増強する。
- 15 このようなG-CSFを産生する細胞としては、マクロファージ、ストローマ細胞、単球、Tリンパ球、繊維芽細胞、血管内皮細胞などが挙げられる。

- G-CSFを薬剤として投与することは、抗ガン剤の副作用としての好中球減少症や骨髄移植後の好中球減少症の治療及び再生不良性貧血の治療に効果を示す。しかし、投与時においては、血中安定性が低いために頻回投与を必要とし、しかも
- 20 投与は静脈投与に限られているために患者、医師の双方に苦痛と負担を強いられてきた。さらに、G-CSFを薬剤として投与すると、副作用として骨痛を起こすことが報告されている。また、G-CSFを産生する細胞としてのマクロファージやストローマ細胞を直接投与することは、細胞であるために種々のタンパクや様々な物質を含んでいるために思わぬ副作用を起こす可能性があるため、そのような治療は行われていない。
- 25

上記の如く、G-CSF自体を投与することによって好中球を分化増殖させる方法では、副作用として骨痛を惹起することばかりでなく、頻回投与が必要であり、患者及び医師にも苦痛と負担を強いられてきたため、他の治療方法の開発が強く

要望されているが、未だ確立されていない。

そこで、本発明者らは、G-CSF自体を投与するのではなく、G-CSFを産生させ、好中球を分化増殖させることを意図し、以前に、G-CSF誘導抗体を提供することに成功している（出願番号特願平9-266591（平成9年（1997）9月30日）、公開番号特開平11-106400（平成11年（1999）4月20日））。

しかしながら、G-CSF誘導抗体が認識する抗原については今だ解明されていなかった。

本発明が解決しようとする課題の一つは、G-CSF誘導抗体の認識する抗原を特定することである。本発明が解決しようとする別の課題は、G-CSF誘導抗体の認識する抗原をコードする遺伝子をクローニングし、同定することである。

発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、G-CSF誘導能を持つモノクローナル抗体をプローブとして使用し、マクロファージ細胞由来のcDNAライブラリーをイムノスクリーニングした結果、3個の陽性クローンの単離に成功し、さらにその塩基配列を決定することにより本発明を提供するに至った。さらに、本発明者らは、ヒト型の抗原遺伝子の塩基配列を決定した。

すなわち、本発明によれば、（a）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；（b）配列表の配列番号2において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；または（c）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質：をコードする遺伝子が提供される。

また、本発明によれば、（a）配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；（b）配列表の配列番号4において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク

質；または (c) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質：をコードする遺伝子が提供される。

さらに、本発明によれば (a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列； (b) 配列表の配列番号1において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または (c) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；を有する遺伝子が提供される。

また、本発明によれば (a) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列； (b) 配列表の配列番号3において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または (c) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；を有する遺伝子が提供される。

上記において、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体は、例えば、寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である。

本発明の遺伝子は例えば、マウスまたはヒト由来の遺伝子である。

さらに本発明によれば、(1) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列において第519番目から第736番目の塩基配列、第666番目から第689番目の塩基配列、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列；(2) 上記(1)に記載した塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；あるいは(3) 上記(1)に記載した塩基配列の何れかと少なくとも80%の相同性を有する塩基配列：の何れかを含有するDNA断

片が提供される。

さらに本発明によれば、(1) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列において第519番目から第736番目の塩基配列、第666番目から第689番目の塩基配列、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列；

- 5 (2) 上記 (1) に記載した塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；あるいは (3) 上記 (1) に記載した塩基配列の何れかと少なくとも80%の相同性を有する塩基配列：の何れかを含み、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする遺伝子が提供される。

- 10 さらに本発明によれば、下記の何れかのタンパク質：(a) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；(b) 配列表の配列番号2において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；(c) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列
15 と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；または (d) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質：が提供
20 される。

- また、本発明によれば、下記の何れかのタンパク質：(a) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；(b) 配列表の配列番号4において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；(c) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列
25 と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；または (d) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導

活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質：が提供される。

上記において、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体は、例えば、寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である。

本発明のタンパク質は好ましくは哺乳動物、特に好ましくは、マウスまたはヒト由来のタンパク質である。

さらに本発明によれば、(1) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、第1番目から第91番目のアミノ酸配列、第50番目から第146番目のアミノ酸配列、第1番目から第78番目のアミノ酸配列、第200番目から第241番目のアミノ酸配列、第172番目から第241番目のアミノ酸配列、第103番目から第150番目のアミノ酸配列、第169番目から第241番目のアミノ酸配列；(2) 上記(1)に記載したアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；あるいは(3) 上記(1)に記載したアミノ酸配列の何れかと少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列：の何れかを含むタンパク質が提供される。

さらに本発明によれば、(1) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、第1番目から第91番目のアミノ酸配列、第50番目から第146番目のアミノ酸配列、第1番目から第78番目のアミノ酸配列、第200番目から第241番目のアミノ酸配列、第172番目から第241番目のアミノ酸配列、第103番目から第150番目のアミノ酸配列、第169番目から第241番目のアミノ酸配列；(2) 上記(1)に記載したアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；あるいは(3) 上記(1)に記載したアミノ酸配列の何れかと少なくとも70%の相同性を有するアミノ酸配列：の何れかを含み、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質が提供される。

さらに本発明によれば、上記した本発明のタンパク質に対する抗体またはそのフラグメントが提供される。抗体は好ましくはモノクローナル抗体であり、特に好ましくはヒト型モノクローナル抗体またはヒトモノクローナル抗体である。

さらに本発明によれば、本発明の遺伝子またはDNA断片を含有する組み換えベクターが提供される。

さらに本発明によれば、本発明の遺伝子またはDNA断片を含有する組み換えベクターを含む形質転換体が提供される。

- 5 さらに本発明によれば、上記した本発明のタンパク質を有する顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質の受容体が提供される。

- さらに本発明によれば、本発明のタンパク質を利用した有用な物質（例えば、当該タンパク質に対するアゴニスト、アンタゴニスト）のスクリーニング方法およびそのスクリーニング方法により得られた物質、並びに受容体に結合すること
10 のできる有用な物質（例えば、当該受容体に対するアゴニスト、アンタゴニスト）が提供される。

- さらに本発明によれば、本発明の遺伝子、DNA断片、タンパク質（タンパク質の断片を含む）、抗体（そのフラグメントを含む）、受容体、物質を含む医薬組成物（特に、感染症または好中球減少症の診断、予防または治療のための医薬
15 組成物）、それらを用いた治療方法が提供される。

発明の詳細な説明

以下において、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。

- 本発明に先だち、本発明者らは、マクロファージ自体を免疫して抗体を取得し、
20 得られた抗体の中からG-CSFを誘導する抗体の単離に成功している（特願平9-266591；この明細書に記載の内容は全て引用により本明細書中に取り込まれるものとする）。本発明の遺伝子は、この抗体をプローブとして用いてマウスマクロファージ由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離されたものであり、本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質は、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有することを特徴とする。
25

（顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメント）

先ず、本明細書で言う「顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体または

そのフラグメント」(本明細書中以下において、「本発明で用いる抗体」とも称する)について、その入手方法などについて説明する。

本発明者らは、まず、マウスマクロファージ細胞株を免疫原としてMRL/lprマウス(自己免疫疾患マウス)に投与し、モノクローナル抗体の単離を行った。

- 5 次いで、得られたモノクローナル抗体を、免疫原細胞であるマウスマクロファージ細胞株に作用させ、該抗体の免疫原細胞に与える影響を検討した結果、得られた抗体の一つが免疫原細胞株であるマウスマクロファージ細胞株から濃度依存的にG-CSFを産生させる特性を有することを見い出した(この抗体を産生するハイブリドーマは国際寄託番号FERM BP-6103として寄託されている)。

- 10 本明細書中で「モノクローナル抗体」とは、マクロファージ細胞株に反応性を有するモノクローナル抗体であり、具体的には、G-CSFを産生させる作用を有するモノクローナル抗体である。

- 本発明で用いる抗体は、マクロファージ細胞株に実質的に結合するという特性を有する。本発明で用いる抗体には、上記性質を有するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を共に包含する。また、「モノクローナル抗体」には、
15 IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなるいずれのイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体をも包含し、好適には、IgGまたはIgMイムノグロブリンクラスモノクローナル抗体である。

- 20 なお、マクロファージ細胞株は、例えば、自然発生の白血病細胞から調製したり、白血病ウイルスによる形質転換から調製することが可能である。

本発明で用いる抗体は常法(例えば、文献「続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、日本生化学会編：東京化学同人発行、等」に記載の方法)に従って取得することができる。

- 25 本発明で用いるモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造されるハイブリドーマ(融合細胞)から製造することができる。すなわち、抗体産生細胞と骨髓腫系細胞から融合ハイブリドーマを形成し、当該ハイブリドーマをクローン化し、マクロファージ細胞株の全部または一部を抗原として、それに対して特異的親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。その操作は免疫抗原としてマクロファージ細胞株の全部または一部を使用する以

外は、従来既知の手段を用いることができる。

免疫抗原は、例えばマクロファージ細胞株そのものを用いるか、マクロファージ細胞株の膜画分若くは溶解抽出液の全部または一部を有する（ポリ）ペプチドの溶液又は例えば完全フロインドアジュバンドとを混和して調製される。免疫の
5 対象として用いられる動物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスが例示される。免疫は、これらの哺乳動物の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内、または腹腔内に1乃至数回注射することにより行われる。

通常、初回免疫から約1〜2週間毎に1〜4度免疫を行い、さらに約1〜4週間後に
10 最終免疫を行って、最終免疫より約3〜5日後に免疫感作された動物から抗体産生細胞が採取される。

本発明で用いるモノクローナル抗体には、「国際寄託番号 FERM BP-6103」のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体（3-4H7抗体）もしくはそのフラグメントまたは該抗体と実質的に同一の性状を有する抗体が含まれる。

15 「3-4H7抗体」は、細胞からのG-CSF産生誘導能を有する。

本発明で用いるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、公知の方法で調製することが可能である。公知の方法としては、例えば、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製には、ケーラー及びミルシュタインらの方法（Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975）及びそれに準じる修飾方法が挙げ
20 られる。すなわち、モノクローナル抗体は、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒトの骨髄腫系細胞（ミエローマ）との融合により得られる融合細胞（ハイブリドーマ）を
25 培養することにより調製される。培養は、インビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターもしくはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ該培養上清、または哺乳動物の腹水から取得することができる。

細胞融合に用いられる骨髄腫系細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ

「P3/X63-AG8」、「P3/NSI/1-Ag4-1」、「P3/X63-Ag8. U1」、「SP2/0-Ag14」、「PAI」、「FO」または「BW5147」、ラット由来ミエローマ「210RCY3-Ag1. 2. 3」、ヒト由来ミエローマ「U-266AR1」、「GM1500-6TG-A1-2」、「UC729-6」、「CEM-AGR」、「D1R11」又は「CEM-T15」などを挙げることができる。

本発明で用いるモノクローナル抗体を産生する融合細胞クローンのスクリーニングは、融合細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の抗原に対する反応性を、例えば、フローサイトメトリー、RIAやELISA等の酵素抗体法によって測定することにより行うことができる。

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地などの低カルシウム培地、MCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地、RD培地などの高カルシウム培地などが挙げられる。該基本培地には、目的に応じて、例えば、血清、ホルモンサイトカインおよび/または各種の無機または有機物質などを含有させることができる。モノクローナル抗体の単離、精製は上述の培養上清または腹水を飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈殿法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52など）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインA若しくはプロテインGカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに付すること、疎水クロマトグラフィーに付することなどにより行うことができる。

本発明で用いるモノクローナル抗体は、上述の製造方法に限定されることなく、いかなる方法で得られたものであってもよい。また、通常「モノクローナル抗体」は、免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明で用いる「モノクローナル抗体」は該糖鎖の構造差異により限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。ファージディスプレイでつくられるモノクローナル抗体、さらに、例えばヒトイムノグロブリン遺伝子を組み込むことにより、ヒト型抗体を産生するように遺伝子工学的に作出されたトランスジェニックマウスを用いて得られるヒト型モノクローナル抗体、あるいは、遺伝子組換え技術により、ある哺乳動物由

来のモノクローナル抗体の定常領域 (Fc領域) をヒトモノクローナル抗体のFc領域と組み換えたキメラモノクローナル抗体、さらには抗原と相補的に直接結合し得る相補性決定部位 (CDR : complementarity-determining residue) 以外、全領域をヒトモノクローナル抗体の対応領域と組換えたヒト化モノクローナル抗体も本発明で用いる「モノクローナル抗体」に包含される。

また、本発明においては「抗体のフラグメント」を使用してもよく、ここで言う、「抗体のフラグメント」とは、少なくとも一つの可変領域を含有する抗体フラグメントの意であり、特願平9-266591にいう「抗体の一部」と同義である。具体的にはFv、F(ab')₂、Fab'あるいはFabを指す。ここで、「F(ab')₂」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL (L鎖可変領域) とCL (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びVH (H鎖可変領域) とCH γ 1 (H鎖定常領域中の γ 1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントをそれぞれFab' という。また、IgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

本発明の遺伝子によりコードされるタンパク質は、上記詳述したような顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有することを特徴とする。本明細書中で言う「結合性」とは、タンパク質と抗体との間の通常の結合性を意味し、慣用的な免疫学的分析法 (例えば、免疫沈降法、ELISA法、イムノプロット法など) を用いて測定できる。

(本発明の遺伝子)

本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはそれと相同性を有するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。本発明はまた、配列表の配列番号1に記載の塩基配列またはそれと相同性を有する塩基配列を有する遺伝子を提供する。

- 5 本発明の遺伝子の種類は特に限定されず、天然由来のDNA、組み換えDNA、化学合成DNAの何れでもよく、またゲノミックDNAクローン、cDNAクロンの何れでもよい。

- 本発明の遺伝子は典型的には、配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するが、これは本発明の一例を示すにすぎない下記の実施例で得られたクローン
10 (MMR19)の塩基配列である。天然の遺伝子の中にはそれを生産する生物種の品種の違いや、生態系の違いに起因する少数の変異やよく似たアイソザイムの存在に起因する少数の変異が存在することは当業者に周知である。従って、本発明の遺伝子は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有する遺伝子のみ限定されるわけではなく、本明細書に記載した特徴を有するタンパク質をコードする全
15 ての遺伝子を包含する。

- 特に、本明細書により本発明のタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列が開示されれば、この配列またはその一部を利用して、ハイブリダイゼーションや、PCRという遺伝子工学の基本的手法を用いて、他の生物種から同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を容易に単離することが
20 できる。このような場合、そのような遺伝子も本発明の範囲に含まれる。

- 相同遺伝子のスクリーニングのために使用するハイブリダイゼーションの条件は特に限定されず、目的の相同遺伝子とプローブとの相同性の度合いなどにより当業者ならば適宜選択することができるが、一般的にはストリンジェントな条件が好ましく、例えば、6×SSC [0. 9MのNaCl、0. 09Mのクエン酸ナトリウム
25 (pH7. 0)]、5×デンハルト (Denhardt' s) 溶液 [1000mL中に1gフィコール、1gポリビニルピロリドン、1gBSA]、0. 5% SDS、25℃～68℃ (例えば37℃、42℃または68℃) ;あるいは0～50%ホルムアミド、6×SSC、0. 5% SDS、25～68℃ (例えば37℃、42℃または68℃) などのハイブリダイゼーション条件を使用することが考えられる。ホルムアミド濃度、デンハルト溶液濃度、

塩濃度及び温度などのハイブリダイゼーション条件を適宜設定することによりある一定の相同性以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAをクローニングできることは当業者に周知であり、このようにしてクローニングされた相同遺伝子は全て本発明の範囲の中に含まれる。

- 5 上記のようなハイブリダイゼーションを使用してクローニングされる相同遺伝子は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列に対して少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有する。

10 (本発明のタンパク質)

本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはそれと相同性を有するタンパク質を提供する。

- 本発明の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質は、それをコードする遺伝子を適当な発現ベクターに組み込み、それを適当な宿主に形質転換して組み換えタンパク質を発現させることによって得ることができる。しかしながら、本発明のタンパク質は、本明細書に記載した特徴を有する限り、その起源、製法などは限定されず、天然産のタンパク質、遺伝子工学的手法により組換えDNAから発現させたタンパク質、あるいは化学合成タンパク質の何れでもよい。
- 15

- 本発明のタンパク質は典型的には、配列表の配列番号1に記載の241個のアミノ酸配列を有する。しかし、天然のタンパク質の中にはそれを生産する生物種の品種の違いや、生態型の違いによる遺伝子の変異、あるいはよく似たアイソザイムの存在などに起因して1から複数個のアミノ酸変異を有する変異タンパク質が存在することは周知である。なお、ここで言う「アミノ酸変異」とは、1以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入及び／又は付加などを意味する。本発明のタンパク質は、クローニングされた遺伝子の塩基配列からの推測に基づいて、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するが、その配列を有するタンパク質のみに限定されるわけではなく、本明細書中に記載した特性を有する限り全ての相同タンパク質を含むことが意図される。相同性は少なくとも50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、
- 20
- 25

特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上である。

一般的に、同様の性質を有するアミノ酸同士の置換（例えば、疎水性アミノ酸同士の置換、親水性アミノ酸同士の置換、酸性アミノ酸同士の置換または塩基性アミノ酸同士の置換）を導入した場合、得られる変異タンパク質は元のタンパク質と同様の性質を有することが多い。遺伝子組換え技術を使用して、このような所望の変異を有する組換えタンパク質を作製する手法は当業者に周知であり、このような変異タンパク質も本発明の範囲に含まれる。

本明細書の以下の実施例では本発明の一例を示すものとして、マウスマクロファージ由来のcDNAのクローニングが示されている。本明細書中に開示されたタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子の配列（マウス由来）またはその一部を利用して、ハイブリダイゼーションまたはPCRなどの遺伝子工学的手法を用いて、他の起源などから同様の生理活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を単離することは当業者の通常の知識の範囲内のことであり、そのようにして単離された遺伝子によりコードされるタンパク質も本発明の範囲に含まれる。

（ヒト型の遺伝子およびタンパク質）

例えば、本発明の遺伝子およびタンパク質に関してヒト由来のホモログを得るための方法の一例としては、以下の方法が挙げられる。

ヒトマクロファージ系細胞株（THP-1、U937、HL-60）から、グアニジウムチオシアネート／フェノールクロロホルム・シングルステップ抽出法（ラボマニユアル遺伝子工学、第3版、第83～84頁、1996）によって、全RNAを抽出し、オリゴ（dT）セルロースカラムを用いて精製して、ポリA⁺RNAを得る。逆転写酵素（MMLV-RTase）とDNAポリメラーゼを用いて二本鎖cDNAを合成する。

この二本鎖cDNAを用いて、Gubler-Hoffmannの方法（Gubler, U. 及び Hoffmann, B. , J. : Gene, 25 : 263-269, 1983）によって、λZAPIIファージベクターを用いてcDNAライブラリーを構築する。本明細書に開示したマウス cDNA（MMR19クローン）の塩基配列（配列番号1）の中でヒトと高い相同性を有する領域（例えば、ヒトと91%の相同性が認められた配列番号1中の172番目か

ら241番目の領域)内の配列を増幅できるプライマーを用いてヒトマクロファージ細胞のcDNAライブラリーを鋳型として増幅させたDNA配列をプローブとして、あるいはこの領域(例えば、配列番号1中の172番目から241番目の領域)を直接プローブとして用いて、ヒトマクロファージ細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって目的タンパク質の全長をコードするcDNAを単離する。5
Primer Walking法によって、cDNAの塩基配列を解析する。目的タンパク質の全長をコードすることが確認されたcDNAをバキュロウイルスに導入し、タンパク質として発現させ、アフィニティカラムによりタンパク質を精製することによりヒト型ホモログタンパク質を得ることができる。

10 上記したように、本発明は、配列番号1に記載の塩基配列または配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する遺伝子とタンパク質、並びにこれらと相同性を有する遺伝子とタンパク質に関するものである。本発明により提供される配列番号1に記載の塩基配列および配列番号2に記載のアミノ酸配列と相同性を有する配列が、他の生物中にも存在するか否かを検索した結果、ヒトのEST (expressed
15 sequence tag)の中に本発明の遺伝子と相同性の高いものが存在することが確認された(以下の実施例3を参照)。従って、このような本発明の塩基配列と高い相同性を有するヒト由来のESTをプローブとして用いてヒト由来の遺伝子ライブラリー(cDNAライブラリーなど)をスクリーニングすることによっても、ヒト由来のホモログ遺伝子を単離できることは明らかである。

20 上記した通り、本発明の配列番号1記載の塩基配列の一部分(即ち、DNA断片)が、ヒトにおいても高い相同性を有して保存されていることがデータベース検索の結果、明らかとなった。このようなDNA断片は、上記したようにヒト由来のホモログ遺伝子をスクリーニングする際のプローブとして有用であり、本発明の一側面を形成する。そのようなDNA断片としては、配列表の配列番号1に記載
25 の塩基配列において第519番目から第736番目の塩基配列、第666番目から第689番目の塩基配列、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列の何れかを含むDNA断片が挙げられ、さらにこれらの何れかにおいて1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列;またはこれらの何れかと少なくとも80%、好ましくは85%以上、より好まし

くは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNA断片も本発明の範囲内である。

また、本発明の配列番号2記載のアミノ酸配列の一部が、ヒトにおいても高い相同性を有して保存されていることがデータベース検索の結果、明らかとなった。このような本発明のタンパク質の一部から成るタンパク質断片は、本発明のタンパク質と同様、G-CSF誘導活性を有する抗体の分析または単離のための試薬として有用であり、また本発明のタンパク質と同様、医薬としても有用である可能性があり、本発明の一側面を形成する。

このようなタンパク質としては、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、第1番目から第91番目のアミノ酸配列、第50番目から第146番目のアミノ酸配列、第1番目から第78番目のアミノ酸配列、第200番目から第241番目のアミノ酸配列、第172番目から第241番目のアミノ酸配列、第103番目から第150番目のアミノ酸配列、第169番目から第241番目のアミノ酸配列の何れかを含むタンパク質が挙げられ、さらにこれらの何れかにおいて1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；またはこれらの何れかと少なくとも70%、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列の何れかを含むタンパク質も本発明の範囲内である。

本発明者らは、上述したものと類似の方法により、ヒト型の抗原遺伝子の塩基配列を決定した（以下の実施例4を参照）。従って、本発明は、配列表の配列番号3に記載の塩基配列またはそれと相同性を有する塩基配列を有する遺伝子を提供する。本発明はまた、配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはそれと相同性を有するタンパク質を提供する。ここで言う相同性の意味、即ち、本発明の範囲が、配列番号3に記載の塩基配列を有する遺伝子または配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に限られないことは、本明細書「本発明の遺伝子」または「本発明のタンパク質」の項で説明したとおりである。

（本発明の抗体）

本発明は、上記した本発明のタンパク質に対する抗体（本明細書中以下におい

て、「本発明のモノクローナル抗体」とも称される)を提供する。以下、本発明の抗体の実施態様および入手方法について詳細に説明する。

- 本発明の抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体の場合にはキメラ抗体でもよく、特にマウス/ヒトキメラ抗体が好ましい。「モノクローナル抗体」には、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなるいずれのイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体をも包含し、好適には、IgGまたはIgMイムノグロブリンクラスモノクローナル抗体である。

- 抗原となる本発明のタンパク質は、それをコードする遺伝子を適当な発現ベクターに組み込み、それを適当な宿主に形質転換して組み換えタンパク質を発現させることによって得ることができる。また、免疫抗原として、例えばマクロファージ細胞株そのもの、マクロファージ細胞株の膜画分を用いることができる。

本発明のポリクローナル抗体(抗血清)あるいはモノクローナル抗体などの抗体は常法(例えば、文献「続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、日本生化学会編:東京化学同人発行、等」に記載の方法)に従って取得することができる。

- 即ち、例えば、抗原を必要に応じてフロイントアジュバンド(Freund's Aduvand)とともに、哺乳動物、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。また、モノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞(ミエローマ細胞)からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することにより製造することができる。

- モノクローナル抗体は、具体的には以下のようにして製造することができる。即ち、本発明のタンパク質あるいは本発明のタンパク質を発現している細胞等を免疫原として用い、必要に応じてフロイントアジュバンド(Freund's Aduvand)とともに、マウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギ、好ましくはマウス、ラットまたはハムスター(これらの動物にはヒト抗体産生ト

ランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む)の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内または腹腔内に1乃至数回注射するか、あるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1日乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。

本発明のモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造されるハイブリドーマ(融合細胞)から製造することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、公知の方法で調製することが可能である。公知の方法としては、ケーラー及びミルシュタインらの方法(Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975)及びそれに準じる修飾方法が挙げられる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の骨髄腫系細胞(ミエローマ)との融合により得られる融合細胞(ハイブリドーマ)を培養することにより調製される。

細胞融合に用いられる骨髄腫系(ミエローマ)細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ「P3/X63-AG8」、「P3/NSI/1-Ag4-1」、「P3/X63-Ag8.U1」、「SP2/0-Ag14」、「X63, 653」、「PAI」、「FO」または「BW5147」、ラット由来ミエローマ「210RCY3-Ag1. 2. 3」、ヒト由来ミエローマ「U-266AR1」、「GM1500-6TG-A1-2」、「UC729-6」、「CEM-AGR」、「D1R11」又は「CEM-T15」などを挙げるができる。

本発明のモノクローナル抗体を産生する融合細胞クローンのスクリーニングは、融合細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の抗原に対する反応性を、例えば、フローサイトメトリー、RIAやELISA等によって測定することにより行うことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギなど、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中などでのインビボで

行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特長、試験研究の目的及び培養方法などの種々の条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持および保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地などの低カルシウム培地、MCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地、RD培地などの高カルシウム培地などが挙げられる。該基本培地には、目的に応じて、例えば、血清、ホルモンサイトカインおよび／または各種の無機または有機物質などを含有させることができる。モノクローナル抗体の単離、精製は上述の培養上清または腹水を飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈殿法、カプロリン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52など）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインA若しくはプロテインGカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに付すること、疎水クロマトグラフィーに付することなどにより行うことができる。

本発明における「キメラ抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、例えば、その可変領域がマウスイムノグロブリン由来の可変領域であって、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体などのキメラモノクローナル抗体を意味する。ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgEなどのアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明における組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。本発明におけるキメラモノクローナル抗体は、例えば、以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものではないことは言うまでもない。

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、

第1. 6巻、第10号、1988年および特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該モノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性名 V_H 遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得した C_H 遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性な V_L 遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列された V_J 遺伝子）の下流にヒトイムノグロブリンをコードするDNAから取得した C_L 遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、Hind III等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0.7%アガロースゲル使用）サザンブロット法を行なう。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカーの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25MのHCl溶液に15分浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベイクン（75℃、3時間）を行なう。ベイクン終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れる。65℃で3～4時間処理する。

次に、この中に ^{32}P 標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液を入れ、65℃で12時間程反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度及び時間（例えば、2×SSC、0.1%SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行なう。上記サザンブロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子

及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をショ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、charon4A、charon28、 λ EMBL3、 λ EMBL4等）に組込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲムノライブラリーを作製する。そのゲムノライブラリーを
5 適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（ κ ）J遺伝子等）を用いて、例えばベント
ンデイビス法（サイエンス（Science）、第196巻、第180～第182頁（1977））
に従って、ブランクハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子或
いはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵
素地図を作成し、塩基配列を決定し、目的とする再配列された V_H （VDJ）遺伝子
10 或いは V_L （VJ）遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒト C_H 遺伝子及びヒト C_L 遺伝子を別に単離する。例え
ば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、 C_H 遺伝子である $C\gamma 1$ 遺伝子
と C_L 遺伝子である $C\kappa$ 遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン
遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒト C
15 $\gamma 1$ 遺伝子及びヒト $C\kappa$ 遺伝子に相当するマウス $C\gamma 1$ 遺伝子及びマウス $C\kappa$ 遺伝子
をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得る
ことができる。

具体的には、例えば、クローンIg146（プロシーディングスナショナルアカデ
ミーオブサイエンス）（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）第75巻、第4709～第
20 4713頁（1978））からの3kbのHindIII-Bam HI断片とクローンMEP10（プロ
シーディングスナショナルアカデミーオブサイエンス）（Proc. Natl. Acad.
Sci. USA）第78巻、第474～第478頁（1981））からの6. 8kbのEcoRI断片をプ
ローブとして用い、ヒトの λ Charon4AのHaeIII-AluIゲムノライブラリー（セル
（Cell）、第15巻、第1157～1174頁（1978））中からヒト κ 遺伝子を含み、エ
ンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒト $C\gamma 1$ 遺伝子は、
25 例えば、ヒト胎児肝細胞DNAをHindIIIで切断し、アガロースゲル電気泳動で分
画した後、5. 9kbのバンドを λ 788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

このようにして得られたマウス V_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子、及びヒト C_H 遺伝
子とマウス C_L 遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考

慮しながらマウス V_H 遺伝子の下流にヒト C_H 遺伝子を、またマウス V_L 遺伝子の下流にヒト C_H 遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えば、pSV2gpt或いはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組込む。この際、マウス V_H 遺伝子／ヒト C_H 遺伝子とマウス V_L 遺伝子／ヒト C_L 遺伝子のキメラ遺伝子は、
5 一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63・Ag8・653細胞或いはSP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法或
10 いはエレクトロポレーション法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

15 本発明における「ヒト型抗体（CDR-grafted抗体）」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には例えば、その超可変領域の相補性決定領域の一部又は全部がマウスモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。
20

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域（CDR：complementarity-determining region；CDR1、CDR2、CDR3）を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つの相補性決定領域の前後に介在する比較的保存
25 された4つの領域（Framework；FR1、FR2、FR3、FR4）を指す。換言すれば、例えばマウスモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部又は全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き換わったモノクローナル抗体を意味する。ヒトイムノグロブリンの対応領域由来の定常領域は、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列

を有するが、本発明におけるヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

- 5 本発明におけるヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものではないことは言うまでもない。例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換ヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開平62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域をコードするヒトH鎖遺伝子と、全マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。
- 10 単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスヒトL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。
- 15 本発明における「ヒト抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。
- 20 ヒト抗体は、常法に従って、例えば少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原或いは免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体或いはモノクローナル抗体の作成法と同様にして製造することができる。

例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、ネイチャージェネティックス (Nature Genetics)、第7巻、第13～21頁、1994年；特表平4-504365号公報；国際出願公開WO94/25585号公報；日経サイエンス、6月号、第40～50頁、1995年；ネイチャー (Nature)、第368巻、第856～859頁、1994年及び特表平6-500233号公報に記載の方法に従って作製することができる。

本発明において「抗体の一部」とは、少なくとも一つの可変領域を含有する抗体フラグメントの意であり、前述の本発明における抗体、好ましくはモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはFv、F(ab')₂、Fab'あるいはFabを指す。ここで、「F(ab')₂」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL (L鎖可変領域) とCL (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びVH (H鎖可変領域) とCH_γ1 (H鎖定常領域中のγ1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントをそれぞれFab' という。また、IgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

(組換えベクターおよび形質転換体)

本発明はさらに、本発明の遺伝子またはDNA断片を含有する組み換えベクターを提供する。

組み換えベクターは、簡便には当業界において入手可能な組み換え用ベクター (例えば、プラスミドDNAなど) に所望の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターの具体例としては、大腸菌由来のプラスミドとしては、例えば、pBluescript、pUC18、pUC19、pBR322など

所望のタンパク質を生産する目的においては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターの種類は、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌用発現ベクターとして、pQE-30、pQE-60、pMAL-C2、pMAL-p2、pSE420などが好ましく、酵母用発現ベクターとしてpYES2（サッカロマイセス属）、pPIC3.5K、pPIC9K、pAO815（以上ピキア属）、昆虫用発現ベクターとしてpBacPAK8／9、pBK283、pVL1392、pBlueBac4.5などが好ましい。

10 プラスミドなどのベクターに本発明の遺伝子のDNA断片を組み込む方法としては、例えば、「Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 53 (1989)」に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組
15 み換えベクター（例えば、組み換えプラスミド）は、以下に記載するような方法で宿主細胞に導入することができる。

本発明の組み換えベクターを宿主細胞に導入（形質転換または形質移入）する方法としては、従来公知の方法を用いて行うことができ、例えば、「Sambrook, J. ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1. 74 (1989)」に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃などを用いる方法などが挙げられる。あるいはまた、例えば、宿主細胞が細菌（*E. coli*、*Bacillus subtilis*等）の場合は、例えばCohenらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法[Mol. Gen. Genet. , 168, 111 (1979)]やコンピテント法[J. Mol. Biol. , 56, 209 (1971)]によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1927 (1978)]やリチウム法[J. Bacteriol. , 153, 163 (1983)]によって、植物細胞の場合は、例えばリーフデ

イスク法[Science, 227, 129 (1985)]、エレクトロポレーション法[Nature, 319, 791 (1986)]によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法[Virology, 52, 456 (1973)]、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法[Mol. Cell. Biol. , 3, 2156-2165 (1983)]によってそれぞれ形質転換することができる。

形質転換体を作成する際に使用する宿主細胞としては、本発明の組み換えベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に制限はなく、本発明の技術分野において通常使用される天然の細胞、または人工的に樹立された組み換え細胞など種々の細胞を用いることが可能である。例えば、細菌（エシェリキア属菌、
10 バチルス属菌）などの原核細胞、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）などの単細胞性宿主を含む下等真核性細胞、カイコなどの高等真核性細胞などが挙げられる。宿主細胞は、大腸菌、酵母、昆虫細胞などが好ましく、具体的には、大腸菌（M15、JM109、BL21等）、酵母（INVSc1（サッカロマイセス属）、GS115、KM71（以上ピキア属）など）、昆虫細胞（BmN4、カイコ幼虫など）
15 などが例示される。また、動物細胞としてはマウス由来、アフリカツメガエル由来、ラット由来、ハムスター由来、サル由来またはヒト由来の細胞若しくはそれらの細胞から樹立した培養細胞株などが例示される。

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター／オペレーター領域、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターおよび複製可能単位から構成される。
20 宿主細胞として酵母、植物細胞、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、ターミネーターを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、所望の遺伝子の
25 5' 側および3' 側の非翻訳領域、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでもよい。

本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG、TGA、TAAなど）が例示される。

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAを意味し、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたプラスミド）および合成プラスミド等が含まれる。

- 5 好適なプラスミドとしては、*E. coli*ではプラスミドpQE30、pETまたはpCALもしくはそれらの人工的修飾物（pQE30、pETまたはpCALを適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母ではプラスミドpYES2もしくはpPIC9Kが、また昆虫細胞ではプラスミドpBacPAK8/9等があげられる。

エンハンサー配列、ターミネーター配列については、例えば、それぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

- 10 選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシンもしくはネオマイシン、ハイグロマイシン、スペクチノマイシンまたはクロラムフェニコール等の抗生物質の耐性遺伝子などが例示される。

- 15 発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、所望のタンパク質をコードする遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他の制限酵素部位など）を用いることができる。

20

（受容体、スクリーニング方法、新規物質）

- 25 本発明の遺伝子がコードするタンパク質はG-CSF誘導刺激の入口として働いていることが考えられる（即ち、本発明は以下の理論により拘束されることはないものの、一つの可能性としては、マクロファージ細胞の表層に存在する本発明のタンパク質に外部からのリガンドが結合して、それにより生じたシグナルが細胞内に伝達されることにより当該マクロファージがG-CSFを放出するようになるというモデルが考えられる）。従って、本発明のタンパク質は、顆粒球コロニー刺激因子の誘導因子の受容体またはその一部でありうる。ここでいう「受容体の一部」とは、受容体を構成するサブユニットの一つである場合、糖鎖等で修飾され

ている場合を含む。この受容体は、例えば寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体またはそのフラグメントのような、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質と結合性（親和性ということもある）を有し、また、マクロファージを含む顆粒球コロニー刺激因子を産生することのできる細胞の細胞膜に存在すると考えられる。本発明はこのよ

5 うな受容体を提供する。

また、本発明はさらに、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする、有用な物質のスクリーニング方法を提供する。このようなスクリーニング方法は、問題の物質と本発明のタンパク質若しくは上記受容体との結合性を測定すること、問題の物質の上記受容体を介した効果（例えば、マクロファージからのG-CSFの産生、適当な形質転換細胞からのマーカーとなる物質の産生）を測定すること、または問題の物質の構造（例えば、問題の物質がタンパク質であるときは、そのアミノ酸配列）と本発明のタンパク質の構造（例えば、アミノ酸配列）とを比較

10 することを含む。

スクリーニングに利用される本発明のタンパク質は、好ましくは（a）配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；（b）配列表の配列番号4において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；（c）配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上（好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは94%以上、最も好ましくは98%以上）の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質または；（d）配列表の配列番号3に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジ

20 ーセントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質である。

より具体的なスクリーニング方法の一例として、次のようなものが考えられ

- る：G-CSFプロモーター遺伝子、その下流のルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン（GFP）、 β -ラクタマーゼまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）等のマーカートンパク質をコードする遺伝子、およびさらに下流のテトラサイクリン、アンピシリン、
- 5 カナマイシン、ネオマイシン、ハイグロマイシンまたはスペクチノマイシン等の薬剤に対する薬剤抵抗性遺伝子を挿入したベクターを構築する。このベクターを、本発明のタンパク質を含む受容体をもつ細胞（例えばマクロファージ細胞株、好ましくはヒト由来マクロファージ細胞株）に導入する。得られた細胞を薬剤を含む培地で処理し、コロニーを形成した細胞群を選抜する。さらに、マーカートン
- 10 パク質を発現しているクローンを選択する。なお、マーカートンパク質の発現が実際のG-CSFmRNAの発現を反映していることを確認しておく。このようにして得られた形質転換細胞株を種々の物質で処理する。そしてマーカートンパク質発現を誘導した物質をスクリーニングする。

- スクリーニングにより得られる有用な物質は（a）受容体と結合性を有し、結合の結果、受容体に変化をもたらし、受容体を介して細胞内に情報を伝達し、そして顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質（アゴニストまたは作用薬ともいう）；（b）受容体と結合性を有し、結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導しない物質（アンタゴニストまたは遮断薬ともいう）；および（c）受容体と結合性を有し、結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を阻害する物質（インバースアゴニストまたは反作用薬ともいう）を含む。
- 15
- 20

- 25 このような物質は新規である。従って、本発明は、上記方法により得られた、（a）受容体と結合性を有し、結合の結果、受容体に変化をもたらし、受容体を介して細胞内に情報を伝達し、そして顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質；（b）受容体と結合性を有し、結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、か

つ顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導しない物質；または (c) 受容体と結合性を有し、結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を阻害する物質をも提供する。また、本発明はさらに、上記受容体と結合性を有し：

5 (a) 結合の結果、受容体に変化をもたらし、受容体を介して細胞内に情報を伝達し、そして顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質；

(b) 結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導しない物質；または (c) 結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導するこ

10 とができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を阻害する物質をも提供する。以下、これらの物質を「本発明の物質」ということもある。

本発明の物質の例としては、本発明の抗体、そのフラグメント、または他の低分子化合物であって：顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導する作用を有するもの；顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害する作用を有するもの；または顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を阻害する作用を有するものがある。

20 上記受容体との結合性（または結合の阻害性）は、問題となる物質が抗体である場合は、例えば、抗体と結合したマクロファージ細胞株をフローサイトメトリーやELISA法などを用いて解析する等の方法により、測定することができる。

顆粒球コロニー刺激因子産生の誘導作用（または阻害作用）は、特開平11-106400に記載された方法により決定されうる。概略を以下に記載する。

25 ピッカジーン エンハンサー ベクター2（和光純薬工業（株）社製）のXho I サイトからNco I サイトにかけて、G-CSFプロモーター遺伝子を挿入し、その下流にG-CSF遺伝子の代りにルシフェラーゼ遺伝子を結合させ、さらにSV40の下流のSal I サイトにpMC1Neo Poly Aから切り出したネオマイシン抵抗性遺伝子を挿入したPicaGCSFneoベクターを構築する。このベクターをRAW264. 7細胞にレトロポレーション法を用いて導入する。得られた細胞をジェネチシ

を含む培地で処理し、コロニーを形成した細胞群を選抜する。ジェネチシン抵抗性クローンからさらに、ルシフェラーゼ活性を示すクローンを選択する。なお、ルシフェラーゼ活性が実際のG-CSF mRNAの発現を反映していることを、³²PラベルマウスG-CSFのcDNAをプローブとして、ノーザンブロット解析により確認しておく。このようにして得られた形質転換マクロファージ細胞株を、96ウェルマイクロプレートにウェル当り 5×10^4 個ずつ播き、37℃で24時間培養し、必要に応じ予め得ておいたアゴニスト、アンタゴニストで処理した後、問題の物質を0, 3. 75, 7. 5, 15, 30および/または60 μ g/ml程度の濃度で添加する。さらに、37℃で18時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定する。

10

(医薬としての本発明の遺伝子等の利用)

本発明の遺伝子は、例えば、血液成分の白血球の一種である好中球が関与する疾患（例えば、好中球減少症など）の診断、予防および治療（遺伝子治療など）などに利用することが可能である。また、本発明のタンパク質若しくはその部分ペプチド、抗体若しくはそのフラグメント、受容体、または物質（以下、これらをまとめて「本発明のタンパク質等」ということもある）は、血液あるいは骨髓中の好中球の数を調整する医薬となり得る。すなわち、本発明の遺伝子およびタンパク質等は、抗ガン剤の副作用としての好中球減少症や骨髓移植後の好中球減少症の治療及び再生不良性貧血の診断、予防および治療などのために用いることが可能である。

20

本発明のタンパク質等は通常、全身または局所的に、一般的には非経口の形で投与することができる。非経口投与の内でも特に好ましくは静脈内投与である。

本発明の遺伝子は、生体内あるいは生体外で細胞に遺伝子を導入するいわゆる遺伝子治療の形で全身または局所的に投与することができる。遺伝子導入は、例えばバイオマニュアルUPシリーズ、遺伝子治療の基礎技術、島田隆、斎藤泉、小澤敬也編：羊土社発行、1996年に記載の方法に従って行うことができる。生体外で細胞に導入する場合には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、カチオニックリポソーム、HVJ-リポソームを用いる方法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法などを用い

25

ることができる。また、生体内で遺伝子を導入する場合には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、カチオニックリポソーム、HVJ-リポソームを用いる方法を挙げることができる。

投与量は、年齢、性別、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間、投与するもの (タンパク質または遺伝子の種類) などにより異なるが、成人一人当たり、一回につき $1\mu\text{g}$ から 100g の範囲、好ましくは $10\mu\text{g}$ から 1000mg の範囲で、一日一回から複数回非経口投与することができるだろう。投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤などを包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤として混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水などが挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類などが挙げられる。

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤 (例えばアルギニン、アスパラギン酸など) のような補助剤を含んでいてもよい。

これらはバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化される。これらはまた無菌の固体組成物を例えば凍結乾燥法などによって製造し、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することもできる。

非経口投与のためのその他の組成物としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびペッサリーなどが含まれる。

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例

実施例1：マクロファージ細胞株よりモノクローナル抗体の認識する抗原遺伝子のクローニング

(1) マクロファージ細胞 (RAW264. 7) からのポリA⁺RNAの調製

- 5 2×10⁸個のマウスマクロファージ細胞 (RAW264. 7) から、グアニジウムチオシアネート/フェノールクロロホルム・シングルステップ抽出法 (ラボマニユアル遺伝子工学、第3版、第83～84頁、1996) によって、約0. 3mgの全RNAを調製した。これをさらにオリゴ (dT) セルロースカラムを用いて精製して、5μgのポリA⁺RNAを得た。

10

(2) ポリA⁺RNAからの二本鎖cDNAの合成

- 上記 (1) で得たポリA⁺RNA (5μg)、逆転写酵素 (MMLV-RTase ; STRATAGENE社製 ; 70units)、dNTPs (0. 6mM) を含む反応液 (50μl) を 37℃にて60分間インキュベートすることによって、第1鎖 (first strand) cDNAを合成した。さらに、上記反応液 (45μl)、DNAポリメラーゼ (STRATAGENE社製 ; 100units)、dNTPs (0. 3mM) を含む反応液を、 16℃にて150分間インキュベートすることによって第2鎖 (second strand) を合成し、二本鎖cDNA (8μg) を得た。

20 (3) cDNAライブラリーの構築

- Gubler-Hoffmannの方法 (Gubler, U. 及びHoffmann, B. , J. : Gene, 25 : 263-269, 1983) によって、PfuDNAポリメラーゼを用いて、上記 (2) で合成された二本鎖cDNAを平滑末端化し、T4DNAリガーゼによってアダプターを連結した。具体的には、上記 (2) で得た二本鎖cDNA (DNA量8μg ; 200μl)、 25 PfuDNAポリメラーゼ (5units) を含む反応液 (全量225μl) を72℃で30分間インキュベートした。

アダプターを連結したDNAを制限酵素XhoIにより末端を切断し、ゲルカラムにより0. 5kbp以上の長さのcDNAを分画した。このcDNAを常法によりT4DNAリガーゼによってλZAPIIファージベクター (Stratagene社) に組み込み、ファージ

ジ粒子内にパッケージングした。ファージの力価を測定した結果、このcDNAライブラリーは 1.2×10^6 個の独立したクローンを含むことが確認された。得られたファージライブラリーを大腸菌 (XL1-Blue MRF') に感染、増殖させて、 3.4×10^9 pfu/mlになるまで増殖させた。

5

(4) 顆粒球コロニー刺激因子の誘導能を持つ抗体と結合性を有するタンパク質をコードする遺伝子のスクリーニング

上記 (3) で構築したcDNAライブラリーに対して、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の誘導能を持つモノクローナル抗体 (寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するもの; 特願平9-266591号明細書に記載) をプローブとしてイムノスクリーニングを行った。具体的手順は以下の通りである。

ファージcDNAライブラリーを大腸菌 (XL1-BlueMRF') に感染させて、直径150mmのプレートに播種した。42℃で4時間インキュベートし、直径0.5mm程のプラークになるまで放置した。10mMのIPTG (イソプロピルチオ-β-ガラクトシド) に浸して風乾しておいたニトロセルロース膜をのせ、37℃に移して、3時間保温した。ニトロセルロース膜を剥がし、5%のスkimミルクを含むTBS-T (20mMトリス塩酸、pH7.6、0.1%Tween20) を用いて、室温で振盪しながら1時間インキュベートして、膜をブロッキングした。その後、TBS-Tで2分間軽く膜をリンスし (2回繰返す)、室温で15分間 (1回)、5分間 (2回) それぞれバッファーに浸して、洗浄した。1%BSA (bovine serum albumin) を含むTBSにより $1.6 \mu\text{g/ml}$ になるまで抗体 (寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するもの) で希釈した。希釈した一次抗体溶液中で、ニトロセルロース膜を室温で振盪しながら、1時間インキュベートし、抗体と反応させた。先の洗浄条件と同様に、ニトロセルロース膜を洗浄した。1%BSAを含むTBSにより、アルカリホスファターゼ標識二次抗体 (ZYMED) を $0.6 \mu\text{g/ml}$ になるまで希釈した。希釈した二次抗体溶液中で、ニトロセルロース膜を室温で振盪しながら1時間インキュベートし、抗体と反応させた。再度、上記の洗浄条件と同様に、ニトロセルロース膜を十分に洗浄し、最後にTBS中で5分洗浄した。100mMのトリス塩酸 (pH9.5)、100mMのNaClおよび5mMのMgCl₂

の緩衝液中に1mlずつNBT溶液（ニトロブルー・テトラゾリウム50mg/ml in 70%ジメチルホルムアミド）とBCIP溶液（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート50mg/ml in ジメチルホルムアミド）を加えてから、ニトロセルロース膜を浸した。暗所で30分間反応させ、膜を水で洗って乾燥させた。乾燥後、ニトロセルロース膜上で陽性反応を示したプラークを元のプレートから拾った。

その結果、一次スクリーニングでは 7×10^5 個のファージから22個の抗体結合陽性プラークを得た。陽性プラークを含むプラーク集団を回収し、増幅後、約1000個のファージから上記と同様の操作で二次、三次、四次スクリーニングを行った結果、3個の陽性クローン（MMR10、MMR17およびMMR19）が単離された。

(5) 遺伝子の塩基配列の決定

上記(4)で得た3個の陽性クローン（MMR10、MMR17およびMMR19）について、常法に従いIn Vivo Excisionによって、 λ ZAPIIファージベクターから挿入DNAを切り出し、pBluescript SK (-) Phagemidに変換して、サブクローニングした。サブクローニングしたクローンは大腸菌（SOLR）中で大量に増殖して約20 μ gのプラスミドDNAを得た。Primer Walking法によって、これらのDNAの塩基配列を解析した。

塩基配列の解析の結果から、MMR19クローンはタンパク質のオープン・リーディング・フレームを含む840bpの完全長のcDNAの塩基配列を有することが判明した。MMR19クローンの塩基配列を配列表の配列番号1に記載する。

(6) cDNAクローンの塩基配列から推定されるタンパク質の一次構造

上記(5)で解析した遺伝子の塩基配列から推定されるタンパク質（MMR-CAM）の一次構造（配列表の配列番号1および2に記載）は、241個のアミノ酸から構成され、アミノ酸配列から推定される分子量は約27kDaであった。MMR-CAMは、1カ所の膜貫通型領域を有するI型膜糖タンパク質であり、細胞外部分は107個、膜貫通部分は23個、細胞内部分は111個のアミノ酸からなると推定される。ホモロジー検索の結果、本発明のタンパク質と構造上類似した分子は特に認

- められず、本発明のタンパク質は既存のファミリーには属さないものと考えられる。また、細胞外領域には、O型糖鎖に豊富な修飾を受ける部分が存在した。細胞内領域には、プロテインキナーゼCやチロシンキナーゼなどのリン酸化部位が存在し、これらの糖鎖とリン酸化部位は、シグナル伝達に極めて重要な役割を担
- 5 っているものと考えられる。

実施例2：本発明のタンパク質（MMR-CAM）の発現

- 実施例1（4）で得たクローン（MMR19）を常法に従い、発現ベクター（λ ZAPII）中に挿入し、大腸菌（XL1-Blue）に形質転換し、形質転換体を構築した。形質転換された大腸菌を培養し、培養上清をドットプロットし、上記（3）
- 10 で使用したのと同じモノクローナル抗体（寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するもの）をプローブとして反応させた結果、培養上清中にこのモノクローナル抗体と結合するタンパク質が存在することが確認できた。

15 実施例3：データベース検索によるマウス由来のタンパク質と他の相同タンパク質との比較

- 実施例1で決定された配列番号1記載の塩基配列およびアミノ酸配列について、データベース検索（DNA DATA BANK of JAPAN (DDBJ)、日本DNAデータバンク：文部省・国立遺伝学研究所・生命情報研究センター）により、ヒ
- 20 トにおける相同遺伝子の有無をアミノ酸レベルおよびDNAレベルの両方で検索した。得られた結果を以下の表1および表2に示す。この結果からは、本発明の遺伝子がヒトにおいても高い相同性とともに保存されていることが示唆される。

表1：アミノ酸レベルでの相同性

配列表1に記載のアミノ酸配列における位置	ヒトホモログにおける同一性
第1番目から第91番目	83/91 (91%)
第50番目から第146番目	83/97 (85%)
第1番目から第78番目	70/78 (89%)
第200番目から第241番目	40/42 (95%)
第172番目から第241番目	67/70 (95%)
第103番目から第150番目	46/48 (95%)
第169番目から第241番目	58/73 (79%)

表2: DNAレベルでの相同性

配列表1に記載の塩基配列における位置	ヒトホモログにおける同一性
第519番目から第736番目	189/218 (86%)
第666番目から第689番目	23/24 (95%)
第381番目から第403番目	22/23 (95%)
第709番目から第727番目	19/19 (100%)

実施例4: 抗原遺伝子のヒト型ホモログのクローニング

- Guanidium Thiocyanate/Phenol Chloroform Extractionの方法によって、ヒトNormal Brain TissueからTotal RNAを抽出し、Oligo (dT)-セルロースによりPoly (A)⁺RNAを精製した。逆転写酵素 (MMLV-RTase) とDNAポリメラーゼとを用いて、Poly (A)⁺RNAよりcDNAsを合成した。マウス抗原遺伝子 (MMR19) 配列の中で4番目から22番目のセンスプライマー (CCATGTCTGGCTGTCAAGC)、714番目から724番目に対するアンチセンスプライマー (CCATTTTCTCCAAGTGGGAGC) を作成し、これらのプライマーを用い、ヒトNormal Brain TissueのcDNAsを鋳型としてPCR反応を行った。その結果、マウス抗原遺伝子 (MMR19) のヒト型ホモログの部分cDNAが得られた。次に、ヒト型ホモログ部分cDNAの特異的プライマー (GSP) とアダプタープライマーを用いて、3' RACE法と5' RACE法を行った。得られた3' RACE断片からアンチセンスプライマー (GTCAGAAGAGATTCAGGGTGACC) および5' RACEの断片からセンスプライマー (AAGCCGTG CGGAGATTGGAGG) を作成し、LD-PCRをした結果、Open Reading Frameを含むヒト型ホモログの全長cDNAが得られた。Primer Walking 法によって、cDNAの924bp塩基配列を明らかにした。得られた塩基配列を配列表の配列番号3に記載する。ヒト型ホモログcDNAの塩基配列 (924bp) は、マウス抗原遺伝子cDNA (840bp) の塩基配列と84. 8%相同 (924塩基中、712塩基が一致) であった。

得られた遺伝子の塩基配列から推定されるタンパク質の一次構造は、242個のアミノ酸から構成される配列番号3および4に示すものである。推定されたアミノ酸配列は、マウスのそれと、93. 8%相同 (242残基中、226残基が一致) であった。このタンパク質もまた、1カ所の膜貫通型領域を有するI型膜糖タンパク質であると推定される。

発明の効果

本発明の遺伝子、それがコードするタンパク質（上記遺伝子の断片および上記タンパク質の断片を含む）、抗体（そのフラグメントを含む）、受容体、および物質は新規であり、医薬用途として有用である。

- 5 また、本発明の遺伝子、それがコードするタンパク質（上記遺伝子の断片および上記タンパク質の断片を含む）、抗体（そのフラグメントを含む）、受容体は、顆粒球コロニー刺激因子の誘導能を有する物質など（例えば、モノクローナル抗体、タンパク質、その他の低分子物質など）をスクリーニングする際の分析試薬としても有用である。
- 10 また、本発明の遺伝子の断片は、他の生物由来のホモログ遺伝子をスクリーニングする際のプローブとしても有用である。

請 求 の 範 囲

1. (a) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
(b) 配列表の配列番号2において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加
5 若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性
を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；または
(c) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を
有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメン
トと結合性を有するタンパク質；
10 をコードする遺伝子。
2. (a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列；
(b) 配列表の配列番号1において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若し
くは挿入された塩基配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する
15 抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする塩基配
列；または
(c) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条
件下でハイブリダイズし、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体ま
たはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；
20 を有する遺伝子。
3. (a) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
(b) 配列表の配列番号4において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加
若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性
25 を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；または
(c) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を
有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメン
トと結合性を有するタンパク質；
をコードする遺伝子。

4. (a) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列；

(b) 配列表の配列番号3において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；または

(c) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする塩基配列；を有する遺伝子。

5. 顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体が寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である、請求項1から4の何れかに記載の遺伝子。

6. マウスまたはヒト由来の遺伝子である、請求項1から5の何れかに記載の遺伝子。

7. (1) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列において第519番目から第736番目の塩基配列、第666番目から第689番目の塩基配列、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列；

(2) 上記 (1) に記載した塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；あるいは

(3) 上記 (1) に記載した塩基配列の何れかと少なくとも80%の相同性を有する塩基配列；

の何れかを含むDNA断片。

8. (1) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列において第519番目から第736番目の塩基配列、第666番目から第689番目の塩基配列、第381番目から第403番目の塩基配列または第709番目から第727番目の塩基配列；

(2) 上記 (1) に記載した塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入された塩基配列；あるいは

(3) 上記 (1) に記載した塩基配列の何れかと少なくとも80%の相同性を有する塩基配列；

- 5 の何れかを含み、顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

9. 下記の何れかのタンパク質：

(a) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

- 10 (b) 配列表の配列番号2において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；

(c) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；または

15 (d) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質。

20 10. 下記の何れかのタンパク質：

(a) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号4において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；

- 25 (c) 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有し、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質；または

(d) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつ顆粒球コロニー刺激因

子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質。

- 1 1. 顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体が寄託番号FERM BP
-6103を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体である、請求項9
5 または10記載のタンパク質。

1 2. マウスまたはヒトを含む哺乳動物由来のタンパク質である、請求項9か
ら11の何れかに記載のタンパク質。

- 10 1 3. (1) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、第1番目から
第91番目のアミノ酸配列、第50番目から第146番目のアミノ酸配列、第1番目か
ら第78番目のアミノ酸配列、第200番目から第241番目のアミノ酸配列、第172番
目から第241番目のアミノ酸配列、第103番目から第150番目のアミノ酸配列、第
169番目から第241番目のアミノ酸配列；

- 15 (2) 上記 (1) に記載したアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠
失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；あるいは

(3) 上記 (1) に記載したアミノ酸配列の何れかと少なくとも70%の相同性を有
するアミノ酸配列；

の何れかを含むタンパク質。

20

- 1 4. (1) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、第1番目から
第91番目のアミノ酸配列、第50番目から第146番目のアミノ酸配列、第1番目か
ら第78番目のアミノ酸配列、第200番目から第241番目のアミノ酸配列、第172番
目から第241番目のアミノ酸配列、第103番目から第150番目のアミノ酸配列、第
25 169番目から第241番目のアミノ酸配列；

(2) 上記 (1) に記載したアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠
失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列；あるいは

(3) 上記 (1) に記載したアミノ酸配列の何れかと少なくとも70%の相同性を有
するアミノ酸配列；

の何れかを含み、かつ顆粒球コロニー刺激因子誘導活性を有する抗体またはそのフラグメントと結合性を有するタンパク質。

15 15. 請求項9から14の何れかに記載のタンパク質に対する抗体またはそのフラグメント。

16. モノクローナル抗体である、請求項15記載の抗体またはそのフラグメント。

10 17. ヒト型モノクローナル抗体またはヒトモノクローナル抗体である、請求項16記載の抗体またはそのフラグメント。

18. 請求項1から8の何れかに記載の遺伝子またはDNA断片を含有する組み換えベクター。

15

19. 請求項1から8の何れかに記載の遺伝子またはDNA断片を含有する組み換えベクターを含む形質転換体。

20 20. 寄託番号FERM BP-6103を有するハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質の受容体であって、請求項9から12の何れかに記載のタンパク質を有し、かつマクロファージを含む顆粒球コロニー刺激因子を産生することのできる細胞に存在する前記受容体。

25 21. 物質と請求項9から12の何れかに記載のタンパク質若しくは請求項20記載の受容体との結合性を測定すること、物質の請求項20記載の受容体を介した効果を測定すること、または物質の構造と本発明のタンパク質の構造とを比較することを含む、以下の何れかの物質のスクリーニング方法：

(a) 請求項20記載の受容体と結合性を有し、結合の結果、受容体に変化をもた

らし、受容体を介して細胞内に情報を伝達し、そして顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質；

- (b) 請求項20記載の受容体と結合性を有し、結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導しない物質；または

(c) 請求項20記載の受容体と結合性を有し、結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を阻害する物質。

22. 請求項9から12の何れかに記載のタンパク質若しくは請求項20記載の受容体との結合性を測定すること、または請求項20記載の受容体を介した効果を測定することを特徴とするスクリーニング方法により得られた以下の何れかの物質：

- (a) 請求項20記載の受容体と結合性を有し、結合の結果、受容体に変化をもたらし、受容体を介して細胞内に情報を伝達し、そして顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質；

(b) 請求項20記載の受容体と結合性を有し、結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導しない物質；または

- (c) 請求項20記載の受容体と結合性を有し、結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を阻害する物質。

23. 請求項20記載の受容体と結合性を有する、下記の何れかの物質：

- (a) 結合の結果、受容体に変化をもたらし、受容体を介して細胞内に情報を伝達し、そして顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質；

(b) 結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導しない物質；または

(c) 結合の結果、顆粒球コロニー刺激因子の産生を誘導することができる物質が受容体と結合するのを阻害し、かつ顆粒球コロニー刺激因子の産生を阻害する物質。

5 2 4. 請求項1から8の何れかに記載の遺伝子若しくはDNA断片、請求項9から14の何れかに記載のタンパク質、請求項15から17の何れかに記載の抗体若しくはそのフラグメント、請求項20に記載の受容体、または請求項22若しくは23記載の物質を含む医薬組成物。

10 2 5. 感染症または好中球減少症を含むG-CSFの関連する疾患または状態の、診断、予防または治療のための請求項23記載の医薬組成物。

15 2 6. 請求項1から8の何れかに記載の遺伝子若しくはDNA断片、請求項9から14の何れかに記載のタンパク質、請求項15から17の何れかに記載の抗体若しくはそのフラグメント、請求項20に記載の受容体、または請求項22若しくは23記載の物質を用いる、感染症または好中球減少症を含むG-CSFの関連する疾患または状態の、診断、予防または治療方法。

20 2 7. 請求項1から8の何れかに記載の遺伝子若しくはDNA断片、請求項9から14の何れかに記載のタンパク質、請求項15から17の何れかに記載の抗体若しくはそのフラグメント、請求項20に記載の受容体、または請求項22若しくは23記載の物質の、感染症または好中球減少症を含むG-CSFの関連する疾患または状態の診断、予防または治療のための使用。

25 2 8. 請求項1から8の何れかに記載の遺伝子若しくはDNA断片、請求項9から14の何れかに記載のタンパク質、請求項15から17の何れかに記載の抗体若しくはそのフラグメント、請求項20に記載の受容体、または請求項22若しくは23記載の物質の、感染症または好中球減少症を含むG-CSFの関連する疾患または状態の診断、予防または治療用医薬の製造への使用。

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN TOBACCO INC.

<120> A novel protein, a gene encoding it and use thereof

<130> YCT-486

<160> 4

<210> 1

<211> 840

<212> DNA

<213> Mouse macrophage cell RAW 264.7

<400>

gaacc atg tct ggc tgt caa gct caa gga gac tgt tgc tgc cgg ccg tgt	50
Met Ser Gly Cys Gln Ala Gln Gly Asp Cys Cys Ser Arg Pro Cys	
1 5 10 15	
ggc gcg cag gac aag gag cac ccc cga ttc ctg atc cca gaa ctt tgc	98
Gly Ala Gln Asp Lys Glu His Pro Arg Phe Leu Ile Pro Glu Leu Cys	
20 25 30	
aaa cag ttt tac cat ctg ggc tgg gtc act ggc act gga ggg gga atc	146
Lys Gln Phe Tyr His Leu Gly Trp Val Thr Gly Thr Gly Gly Gly Ile	
35 40 45	
agc ttg aag cat ggc aat gaa atc tac att gct ccc tca ggc gtg caa	194
Ser Leu Lys His Gly Asn Glu Ile Tyr Ile Ala Pro Ser Gly Val Gln	
50 55 60	
aag gag cgc att cag cca gaa gac atg ttt gtg tgt gac att aat gag	242
Lys Glu Arg Ile Gln Pro Glu Asp Met Phe Val Cys Asp Ile Asn Glu	
65 70 75	
cag gac ata agc ggg cct cca gca tct aag aag ctg aaa aaa agc cag	290
Gln Asp Ile Ser Gly Pro Pro Ala Ser Lys Lys Leu Lys Lys Ser Gln	

80	85	90	95	
tgc act cct ctt ttc atg aat gct tat acc atg aga gga gct ggc gca	338			
Cys Thr Pro Leu Phe Met Asn Ala Tyr Thr Met Arg Gly Ala Gly Ala				
100	105	110		
gtg att cat acc cac tct aaa gct gct gtg atg gct acc ctt ctg ttt	386			
Val Ile His Thr His Ser Lys Ala Ala Val Met Ala Thr Leu Leu Phe				
115	120	125		
cca gga cag gag ttt aaa att aca cat caa gag atg atc aaa gga ata	434			
Pro Gly Gln Glu Phe Lys Ile Thr His Gln Glu Met Ile Lys Gly Ile				
130	135	140		
agg aaa tgt acc tca gga ggc tat tac aga tac gat gat atg tia gtg	482			
Arg Lys Cys Thr Ser Gly Gly Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Met Leu Val				
145	150	155		
gta cct att att gag aac act cct gaa gag aag gat ctc aaa gaa agg	530			
Val Pro Ile Ile Glu Asn Thr Pro Glu Glu Lys Asp Leu Lys Glu Arg				
160	165	170	175	
atg gct cat gcc atg aat gag tac cca gac tcc tgt gcg gtt ctt gtc	578			
Met Ala His Ala Met Asn Glu Tyr Pro Asp Ser Cys Ala Val Leu Val				
180	185	190		
cgg cgt cat ggg gtg tac gtg tgg gga gaa aca tgg gag aaa gca aaa	626			
Arg Arg His Gly Val Tyr Val Trp Gly Glu Thr Trp Glu Lys Ala Lys				
195	200	205		
acc atg tgt gag tgt tat gac tac ctg ttt gac att gct gtc tcc atg	674			
Thr Met Cys Glu Cys Tyr Asp Tyr Leu Phe Asp Ile Ala Val Ser Met				
210	215	220		
aag aag atg gga ctc gat cca aca cag ctc cca gtt gga gaa aat gga	722			
Lys Lys Met Gly Leu Asp Pro Thr Gln Leu Pro Val Gly Glu Asn Gly				
225	230	235		
att gtg taa gccaaagtga tgcctaagca tctccaacaa taaaacaaac tcaattatgc	781			

Ile Val

240

ctttaaataaaa actcagctgc ttttaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840

<210> 2

<211> 241

<212> PRT

<400>

Met Ser Gly Cys Gln Ala Gln Gly Asp Cys Cys Ser Arg Pro Cys
 1 5 10 15
 Gly Ala Gln Asp Lys Glu His Pro Arg Phe Leu Ile Pro Glu Leu Cys
 20 25 30
 Lys Gln Phe Tyr His Leu Gly Trp Val Thr Gly Thr Gly Gly Gly Ile
 35 40 45
 Ser Leu Lys His Gly Asn Glu Ile Tyr Ile Ala Pro Ser Gly Val Gln
 50 55 60
 Lys Glu Arg Ile Gln Pro Glu Asp Met Phe Val Cys Asp Ile Asn Glu
 65 70 75
 Gln Asp Ile Ser Gly Pro Pro Ala Ser Lys Lys Leu Lys Lys Ser Gln
 80 85 90 95
 Cys Thr Pro Leu Phe Met Asn Ala Tyr Thr Met Arg Gly Ala Gly Ala
 100 105 110
 Val Ile His Thr His Ser Lys Ala Ala Val Met Ala Thr Leu Leu Phe
 115 120 125
 Pro Gly Gln Glu Phe Lys Ile Thr His Gln Glu Met Ile Lys Gly Ile
 130 135 140
 Arg Lys Cys Thr Ser Gly Gly Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Met Leu Val
 145 150 155
 Val Pro Ile Ile Glu Asn Thr Pro Glu Glu Lys Asp Leu Lys Glu Arg

160 165 170 175
 Met Ala His Ala Met Asn Glu Tyr Pro Asp Ser Cys Ala Val Leu Val
 180 185 190
 Arg Arg His Gly Val Tyr Val Trp Gly Glu Thr Trp Glu Lys Ala Lys
 195 200 205
 Thr Met Cys Glu Cys Tyr Asp Tyr Leu Phe Asp Ile Ala Val Ser Met
 210 215 220
 Lys Lys Met Gly Leu Asp Pro Thr Gln Leu Pro Val Gly Glu Asn Gly
 225 230 235
 Ile Val
 240

<210> 3

<211> 924

<212> DNA

<213> Human normal brain tissue

<400>

aagccgtgcg gagattggag gccgcgcggg tcccttggtct gggcc 45
 atg tct ggc tgt gat gct tgg gag gga gac tgt tgt tcc cgg aga tgc 93
 Met Ser Gly Cys Asp Ala Trp Glu Gly Asp Cys Cys Ser Arg Arg Cys
 1 5 10 15
 ggc gcg cag gac aag gag cat cca aga tac ctg atc cca gaa ctt tgc 141
 Gly Ala Gln Asp Lys Glu His Pro Arg Tyr Leu Ile Pro Glu Leu Cys
 20 25 30
 aaa cag ttt tac cat tta ggc tgg gtc act ggg act gga gga gga att 189
 Lys Gln Phe Tyr His Leu Gly Trp Val Thr Gly Thr Gly Gly Gly Ile
 35 40 45
 agc ttg aag cat ggc gat gaa atc tac att gct cct tca gga gtg caa 237
 Ser Leu Lys His Gly Asp Glu Ile Tyr Ile Ala Pro Ser Gly Val Gln

50	55	60	
aag gaa cga att cag cct gaa gac atg ttt gtt tat gat ata aat gaa	285		
Lys Glu Arg Ile Gln Pro Glu Asp Met Phe Val Tyr Asp Ile Asn Glu			
65	70	75	80
aag gac ata agt gga cct tcg cca tcg aag aag cta aaa aaa agc cag	333		
Lys Asp Ile Ser Gly Pro Ser Pro Ser Lys Lys Leu Lys Lys Ser Gln			
85	90	95	
tgt act cct ctt ttc atg aat gct tac aca atg aga gga gca ggt gca	381		
Cys Thr Pro Leu Phe Met Asn Ala Tyr Thr Met Arg Gly Ala Gly Ala			
100	105	110	
gtg att cat acc cac tct aaa gct gct gtg atg gcc acc ctt ctc ttt	429		
Val Ile His Thr His Ser Lys Ala Ala Val Met Ala Thr Leu Leu Phe			
115	120	125	
cca gga cgg gag ttt aaa att aca cat caa gag atg ata aaa gga ata	477		
Pro Gly Arg Glu Phe Lys Ile Thr His Gln Glu Met Ile Lys Gly Ile			
130	135	140	
aag aaa tgt act tcc gga ggg tat tat aga tat gat gat atg tta gtg	525		
Lys Lys Cys Thr Ser Gly Gly Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Met Leu Val			
145	150	155	160
gta ccc att att gag aat aca cct gag gag aaa gac ctc aaa gat aga	573		
Val Pro Ile Ile Glu Asn Thr Pro Glu Glu Lys Asp Leu Lys Asp Arg			
165	170	175	
atg gct cat gca atg aat gaa tac cca gac tcc tgt gca gta ctg gtc	621		
Met Ala His Ala Met Asn Glu Tyr Pro Asp Ser Cys Ala Val Leu Val			
180	185	190	
aga cgt cat gga gia tat gtg tgg ggg gaa aca tgg gag aag gcc aaa	669		
Arg Arg His Gly Val Tyr Val Trp Gly Glu Thr Trp Glu Lys Ala Lys			
195	200	205	
acc atg tgt gag tgt tat gac tat tta ttt gat att gcc gta tca atg	717		

Thr Met Cys Glu Cys Tyr Asp Tyr Leu Phe Asp Ile Ala Val Ser Met
 210 215 220
 aag aaa gta gga ctt gat cct tca cag ctc cca gtt gga gaa aat gga 765
 Lys Lys Val Gly Leu Asp Pro Ser Gln Leu Pro Val Gly Glu Asn Gly
 225 230 235 240
 att gtc taa gccaaaagaa agtctaatta tatacagaga taaagctaaa 814
 Ile Val
 cgtaattatt atttaaataa aagctatittt tttaaataa ttgaaatittt tcatgatgct 874
 actaatttgc cactaaatac tgcaaatggc caccctgaat ctcctctgac 924

<210> 4

<211> 242

<212> PRT

<400>

Met Ser Gly Cys Asp Ala Trp Glu Gly Asp Cys Cys Ser Arg Arg Cys
 1 5 10 15
 Gly Ala Gln Asp Lys Glu His Pro Arg Tyr Leu Ile Pro Glu Leu Cys
 20 25 30
 Lys Gln Phe Tyr His Leu Gly Trp Val Thr Gly Thr Gly Gly Gly Ile
 35 40 45
 Ser Leu Lys His Gly Asp Glu Ile Tyr Ile Ala Pro Ser Gly Val Gln
 50 55 60
 Lys Glu Arg Ile Gln Pro Glu Asp Met Phe Val Tyr Asp Ile Asn Glu
 65 70 75 80
 Lys Asp Ile Ser Gly Pro Ser Pro Ser Lys Lys Leu Lys Lys Ser Gln
 85 90 95
 Cys Thr Pro Leu Phe Met Asn Ala Tyr Thr Met Arg Gly Ala Gly Ala
 100 105 110
 Val Ile His Thr His Ser Lys Ala Ala Val Met Ala Thr Leu Leu Phe

115	120	125	
Pro Gly Arg Glu Phe Lys Ile Thr His Gln Glu Met Ile Lys Gly Ile			
130	135	140	
Lys Lys Cys Thr Ser Gly Gly Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Met Leu Val			
145	150	155	160
Val Pro Ile Ile Glu Asn Thr Pro Glu Glu Lys Asp Leu Lys Asp Arg			
165	170	175	
Met Ala His Ala Met Asn Glu Tyr Pro Asp Ser Cys Ala Val Leu Val			
180	185	190	
Arg Arg His Gly Val Tyr Val Trp Gly Glu Thr Trp Glu Lys Ala Lys			
195	200	205	
Thr Met Cys Glu Cys Tyr Asp Tyr Leu Phe Asp Ile Ala Val Ser Met			
210	215	220	
Lys Lys Val Gly Leu Asp Pro Ser Gln Leu Pro Val Gly Glu Asn Gly			
225	230	235	240
Ile Val			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, 892050, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 20 January, 1999 (20.01.99) & JP, 11-032783, A & CA, 2229464, A	1-19, 24
X	Yoshisuke Nishi, et al., "Kou Seinou Koutai no Kouritsuteki Sentaku Process no Kaihatsu", Proceedings of Biotechnology Symposium (1998), Vol.16th, pp.161-166	1-25, 28
X	Yoshisuke Nishi, et al., "Kou Seinou Koutai no Kouritsuteki Sentaku Process no Kaihatsu", Proceedings of Biotechnology Symposium (1997), Vol.15th, pp.159-164	1-25, 28
P, X	JP, 11-106400, A (JAPAN TOBACCO INC.), 20 April, 1999 (20.04.99) (Family: none)	1-25, 28
A	AOKI, Y. et al. "Stimulation of G-CSF gene expression in the macrophage cell line by contact with extracellular matrix proteins and a pre-B leukaemia cell line", Cytokine (1998) Vol.10, No.8, p.596-602	1-25, 28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search
22 May, 2000 (22.05.00)

Date of mailing of the international search report
30 May, 2000 (30.05.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02080

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26-27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claims 26-27 relates to a method for treatment of the human body by therapy or diagnosis.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12N 1/21, G01N 33/577, A61K 48/00, A61K 38/17, A61K 39/395, A61P 31/00 // C12P 21/08, (C12N 1/21, C12R 1:19)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイブ (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 892050, A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 20. 1月. 1999 (20. 01. 99) & JP, 11-032783, A & CA, 2229464, A	1-19, 24
X	西 義介 他「高機能抗体の効率的選択プロセスの開発」 バイオテクノロジーシンポジウム予稿集 (1998) Vol. 16th, p. 161-166	1-25, 28
X	西 義介 他「高機能抗体の効率的選択プロセスの開発」 バイオテクノロジーシンポジウム予稿集 (1997) Vol. 15th, p. 159-164	1-25, 28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 05. 00

国際調査報告の発送日

30.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP, 11-106400, A (日本たばこ産業株式会社) 20. 4月. 1999 (20. 04. 99) (ファミリーなし)	1-25, 28
A	AOKI, Y. et al. "Stimulation of G-CSF gene expression in the macrophage cell line by contact with extracellular matrix proteins and a pre-B leukaemia cell line", Cytokine (1998) Vol. 10, No. 8, p. 596-602	1-25, 28

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 26-27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲26-27は、人の身体の治療方法又は診断方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。